

На правах рукописи



ГАББАСОВ РАШИД ТАГИРОВИЧ

**РОЛЬ NEDD9 В РЕГУЛЯЦИИ ОНКОГЕННОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ
СИГНАЛИЗАЦИИ В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ ЯИЧНИКОВ**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань 2016

Работа выполнена на кафедре генетики, НИЛ «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний» Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» МОиН РФ, в лаборатории Онкологического Центра Фокс Чейз (г. Филадельфия, США)

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Бабынин Эдуард Викторович

**Официальные
оппоненты:**

Фаизов Тагир Хадиевич, доктора ветеринарных наук (специальность по защите 14.00.16 – физиология), профессор биохимии, заведующий лабораторией биохимии и молекулярно-генетического анализа ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (г. Казань);

Кирсанов Кирилл Игоревич, кандидат биологических наук (14.01.12), старший научный сотрудник отдела химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБНУ РОНЦ «Российский Онкологический Научный Центр им. Н.Н. Блохина» (г. Москва)

Ведущая организация: ГБОУ ВПО Минздрава РФ «**Казанский государственный медицинский университет**» (г. Казань)

Защита диссертации состоится 24 ноября 2016 г. в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420055, Республика Татарстан, г. Казань, ул. К. Маркса 74, Казанский (Приволжский) федеральный университет, аудитория № 205А.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, доктор биологических наук



Абрамова З.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

По показателю летальности рак яичников находится на первом месте среди всей онкогинекологической патологии (Siegel *et. al.*, 2013). До 90% случаев данного заболевания имеют эпителиальную природу, то есть являются карциномами (Савельева *и др.*, 2009). Средняя пятилетняя выживаемость больных эпителиальным раком яичников (ЭРЯ) не превышает 40% (Banerjee and Kaye, 2013), а на поздних стадиях может составить менее 20% (Kim *et. al.*, 2012). Высокая летальность ЭРЯ связана с отсутствием надёжных методов ранней диагностики, низкой эффективностью применяемых способов лечения и почти полной невозможностью спрогнозировать развитие заболевания (Vaughan *et al.* 2011, Kim *et al.*, 2012). Для улучшения качества борьбы с ЭРЯ необходимо более глубокое понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе развития данной патологии.

Одним из белков, активно изучаемых в настоящее время в контексте биологии злокачественных заболеваний, является скаффолд-протеин NEDD9. Показано, что изменённая - как правило, повышенная - экспрессия NEDD9 способствует онкогенезу и повышает агрессивность клеток ряда солидных и гематологических злокачественных опухолей (Shagisultanova *et. al.*, 2015). Это связано с тем, что NEDD9 принимает участие во множестве молекулярных процессов как в нормальных, так и перерождённых клетках. Известно, что, среди прочих функций, NEDD9 участвует в работе фокальных контактов (ФК), регулируя экспрессию и активность тирозиновых киназ FAK и Src (O'Neill *et. al.*, 2007). В то же время, повышенная экспрессия NEDD9 способствует протеосомной деградации белка межклеточной адгезии Е-кадгерина по Src-зависимому механизму, что может привести к эпителиально-мезенхимальному переходу (Tikhmyanova and Golemis, 2011). Таким образом, NEDD9 может участвовать в миграции и инвазии раковых клеток. Также в ряде солидных опухолей NEDD9 контролирует активацию белков семейства АКТ, серин-треониновых киназ, участвующих в регуляции апоптоза (Tikhmyanova *et. al.*, 2010), и клеточное деление, опосредованно регулируя экспрессию и активацию таких серин-треониновых киназ, как ERK и Aurora A (Tikhmyanova *et. al.*, 2010, Ice *et. al.*, 2013).

В последние два десятилетия развилось представление о клеточно-молекулярном микроокружении опухоли, в частности о клетках системы иммунитета, как интегральной части опухоли яичников, принимающей участие во всех стадиях развития ЭРЯ (Tsai *et. al.*, 2014). В связи с этим, особый интерес представляют данные об участии NEDD9 в миграции и хемотаксисе Т- и В-лимфоцитов (Minegishi *et al.*, 1996, Manie *et. al.*, 1997).

Появляются данные о ранее неизвестных ролях транскрипционного фактора STAT3 в развитии злокачественных заболеваний. Есть данные указывающие на участие STAT3 в работе ФК, и, следовательно, в миграции клеток карциномы яичников (Silver *et. al.*, 2004). Учитывая важную роль NEDD9 в функционировании ФК, представляется интересным исследовать наличие взаимодействия между NEDD9 и STAT3.

Несмотря на имеющиеся сведения об онкогенности NEDD9 в контексте различных видов злокачественных опухолей, на момент выполнения настоящей работы механизмы, через которые NEDD9 влияет на развитие ЭРЯ, неизвестны. В связи с этим, была поставлена **цель** – выявить механизмы участия NEDD9 в регуляции онкогенных молекулярных процессов, происходящих в эпителиальных опухолях яичников.

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

1. Определить роль NEDD9 в развитии и распространении карциномы яичников, а также регуляции экспрессии и активации сигнальных белков, участвующих в миграции, пролиферации и выживании клеток ЭРЯ;
2. Сравнить влияние экспрессии NEDD9 в клеточном микроокружении на рост, метастазирование и онкогенную сигнализацию в эпителиальных опухолях яичников с таковым в клетках первичной опухоли;
3. Установить, участвует ли NEDD9 в активации STAT3 и локализации последнего в фокальных контактах клеток ЭРЯ;
4. Исследовать влияние NEDD9 на общую генную экспрессию в опухолях яичников для возможного обнаружения ранее неизвестных молекулярных взаимодействий NEDD9.

Научная новизна

В работе впервые рассмотрены молекулярные механизмы участия скаффолд-протеина NEDD9 в развитии рака яичников. Показано, что делеция одноимённого

гена, кодирующего белок NEDD9, замедляет рост и уменьшает агрессивность эпителиальных опухолей яичников и приводит к понижению активации онкогенных киназ FAK, Src, AKT1 и экспрессии белка клеточной адгезии E-кадгерина и Aurora A киназы. Обнаружены ранее неизвестные молекулярные взаимодействия NEDD9. Так, в настоящей работе показано, что белки NEDD9 и FAK, но не Src, образуют комплекс с транскрипционным фактором STAT3 и участвуют в активации и локализации последнего в фокальных контактах клеток ЭРЯ. Кроме того, выявлена роль NEDD9 в отрицательной регуляции генной и белковой экспрессии транскрипционного фактора FOXJ1 и транскрипции регулируемых FOXJ1 генов, в частности, участвующих в работе подвижных ресничек. Убедительно продемонстрировано, что принципиальный вклад в агрессивность ЭРЯ вносит экспрессия NEDD9 в первичной опухоли, но не клеточном микроокружении.

Научно-практическая значимость работы

Полученные данные вносят вклад в понимание механизмов миграции, инвазии, пролиферации и выживания клеток в контексте эпителиального рака яичников; представляют интерес с клинической точки зрения, в частности, указывают на то, что NEDD9, с одной стороны, малопригоден как маркер при малоинвазивном прогнозировании эпителиального рака яичников, а с другой - на возможность использования NEDD9 в качестве маркера для анализа биоптатного материала с целью прогнозирования течения эпителиального рака яичника. Данные о транскрипционной регуляции ряда генов со стороны NEDD9 открывают возможности для новых направлений исследований молекулярной сигнализации в эпителиальных опухолях яичников.

Положения, выносимые на защиту

1. В контексте эпителиального рака яичников NEDD9 положительно регулирует экспрессию и активацию киназ FAK, Src, AKT1, а также общую экспрессию E-кадгерина и Aurora A киназы. Кроме того, NEDD9, а также FAK, но не Src, образуют комплекс с транскрипционным фактором STAT3, регулируют его экспрессию и активацию, а также локализацию STAT3 в фокальных контактах клеток карциномы яичников.
2. Экспрессия NEDD9 в первичных опухолях, но не в их клеточном микроокружении, способствует агрессивности эпителиального рака яичников

через положительную регуляцию онкогенной сигнализации, роста и метастазирования опухолей, а также частоты развития опухолевых асцитов.

3. В контексте спонтанной карциномы яичников NEDD9 регулирует генную и белковую экспрессию транскрипционного фактора FOXJ1, и таким образом опосредованно участвует в регуляции транскрипции генов-мишеней FOXJ1: *Dnali1*, *Dynlrb2*, *Kif9*, *Nek5*, *Rsph4a*, *Spa17*, *Spag6* и *Tuba1a*.

Апробация работы

Основные результаты исследований представлялись на 18-ой, 19-ой и 20-ой ежегодных научных конференциях студентов и аспирантов Онкологического центра «Фокс Чейз» (Филадельфия, США, 2013-2015); 2-ом и 3-ем ежегодных симпозиумах университета Тэмпл, посвящённых проблемам трансляционной науки (Филадельфия, США, 2013 и 2014); 105-ом ежегодном конгрессе Американской Ассоциации по исследованию рака (Сан-Диего, США, 2014); 4-ой Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2014); 7-ом и 8-ом Всероссийских конгрессах молодых биологов «Симбиоз-Россия» (Екатеринбург, 2014 и Новосибирск, 2015); 10-й Международной (19-ой всероссийской) Пироговской научной конференции студентов и молодых учёных (Москва, 2015); 2-ой Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio (Новосибирск, Кольцово, 2015).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, среди которых 2 публикации в журналах базы SCOPUS.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 119 страницах машинописного текста, включает 27 рисунков и 4 таблицы. Библиография включает 138 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты исследований. В экспериментах *in vivo* использовали трансгенные мышинные линии *MISIIR-TAg* (TAg), *MISIIR-TAg-low* (TAg-low), а также мышей,

нокаутных по гену *Nedd9*. Все три линии были ранее созданы на основе мышей линии C57BL/6. *TAg*-мыши экспрессируют гены большого и малого Т-антигенов вируса SV40 под контролем промотора гена рецептора антимюллерова гормона II типа (*MISIIR*), экспрессия которого в поверхностном эпителии яичников повышена относительно других тканей мыши (Connolly *et. al.*, 2003). Вследствие локализованной экспрессии Т-антигенов, мыши *TAg* с пенетрантностью 100% развивают билатеральные эпителиальные опухоли яичников (ОЯ), по гистологическим и генетическим характеристикам близкие серозным эпителиальным ОЯ человека (Connolly *et. al.*, 2003). Мыши линии *TAg-low* экспрессируют Т-антиген на относительно низком уровне, не приводящем к спонтанному развитию ЭРЯ (Quinn *et. al.*, 2010); в настоящей работе использовались в качестве сингенных реципиентов клеток, выделенных из мышей *TAg*. Для получения Т-антиген экспрессирующих животных, нокаутных по гену *Nedd9*, мышей *TAg* и *TAg-low* скрещивали с *Nedd9*^{-/-} мышами (любезно предоставлены лабораторией Seo, Университет Токио, Япония). Последние фертильны и здоровы, с единственной описанной аномалией: вследствие пониженной мигративности, у них снижено присутствие В-лимфоцитов в маргинальной зоне, а также общее количество лимфоцитов в костном мозге и тимусе (Seo *et. al.*, 2005). В экспериментах *in vitro* использовали клеточные линии ЭРЯ мыши MOVCAR (mouse ovarian carcinoma) 6111, 5009, 8248, 8250 (*TAg*; *Nedd9*^{+/+}) и MOVCAR 136, 143, 145, 168 (*TAg*; *Nedd9*^{-/-}), изолированные из *TAg*-мышей соответствующего генотипа. Кроме того, использовали клеточные линии ЭРЯ человека: OVCAR5 и A1847.

In vivo магнитно-резонансная томография. Динамику роста опухолей у *TAg*; *Nedd9*^{+/+} и *TAg*; *Nedd9*^{-/-} мышей отслеживали при помощи еженедельной магнитно-резонансной томографии (МРТ) на спектрометре Bruker DRX 300 с индукцией магнитного поля 7 Тл. Вычисление объёмов опухолей производили на компьютерной программе MRICro (Hensley *et.al.*, 2007).

Анализ инфильтрации иммунных клеток в ткани мышей. Инфильтрацию иммунных клеток опухоли, мезентериальные лимфатические узлы, селезёнки и смывы перитонеального экссудата *TAg* и *TAg-low* мышей исследовали при помощи проточной цитометрии на цитометре LSR-II Flow Analyzer (BD, США). Следующие популяции клеток были мечены соответствующими комбинациями антител: CD45⁺CD4⁺ Т-хэлперы, CD45⁺FoxP3⁺ Т-регуляторные клетки, CD45⁺CD8⁺ Т-киллеры,

CD45⁺NK1.1⁺CD3e⁺ естественные киллеры (NK-клетки), CD45⁺CD19⁺ В-лимфоциты, CD45⁺F4/80⁺CD11b⁺ макрофаги и CD45⁺CD11b⁺Gr-1⁺ миелоидные супрессорные клетки. Данные обрабатывали в компьютерной программе FlowJo 9.8.

Анализ влияния нарушения экспрессии NEDD9 на агрессивность клеток ЭРЯ.

Клеточную пролиферацию исследовали при помощи набора реагентов Cy-Quant по инструкции производителя (Invitrogen, США). Оценивали адгезивность клеток к фибронектину или коллагену I-ого типа. Клеточную миграцию и инвазию в матрикеле в градиенте фетальной бычьей сыворотки (ФБС) оценивали при помощи клеточного анализатора xCELLigence (Roche, Германия), работающего по принципу камер Бойдена (Boyden, 1962). Анализ миграции клеток по двумерной поверхности проводили моделируя «рану» на монослое клеток.

Нокдаун генов NEDD9, STAT3, Fak и Src в клетках ЭРЯ мыши и человека. Для нокдауна гена *NEDD9* клеточные линии ЭРЯ мыши (MOVCAR 6111 и 5009) и человека (OVCAR5 и A1847) трансдуцировали, соответственно, лентивирусными векторами pLKO1 и pGIPZ, экспрессирующими соответствующие короткие шпилечные РНК (кшРНК; Dharmacon, США). Вирусные частицы нарабатывали в клетках линии HEK293T, трансдуцированных набором плазмид ViraPower Lentiviral Expression System (Invitrogen) при помощи реагента Polybrene по инструкции производителя (Invitrogen). Нокдаун генов *Stat3*, *Fak* и *Src* в клеточной линии MOVCAR 5009 провели при помощи наборов соответствующих специфических коротких интерферирующих РНК (киРНК) ON-TARGETplus (Dharmacon) при помощи реагента DharmaFECT в соответствии с инструкцией производителя (Dharmacon).

Анализ влияния делеции гена *Nedd9* в микроокружении опухоли на развитие ЭРЯ. Для исследования влияния делеции *Nedd9* в микроокружении опухоли на развитие ОЯ, *Nedd9*^{+/+} клетки MOVCAR 5009 ортотопически вживляли в сингенных по отношению к ним TAg-low;*Nedd9*^{+/+} и TAg-low;*Nedd9*^{-/-} мышей (рис. 1А) по Quinn и др. (Quinn *et. al.*, 2010). Провели три независимых эксперимента, в каждом из которых использовали 10 мышей каждого генотипа. Клетки MOVCAR 5009 предварительно трансдуцировали ретровирусным вектором pWZL-luc (любезно предоставлен лабораторией доктора Murphy, Институт Вистара, Филадельфия, США), несущим гены люциферазы и устойчивости к гигромицину Б. Нарработку вирусных частиц проводили при помощи клеток Phoenix Eco (Swift *et. al.*, 2001). Динамику

роста опухолей в *TA_g-low* мышах отслеживали *in vivo* при помощи биолюминисцентного имиджинга на установке IVIS Spectrum (Perkin Elmer, США), предварительно интраперитонеально вводя мышам раствор люциферина светляка, и еженедельной пальпации.

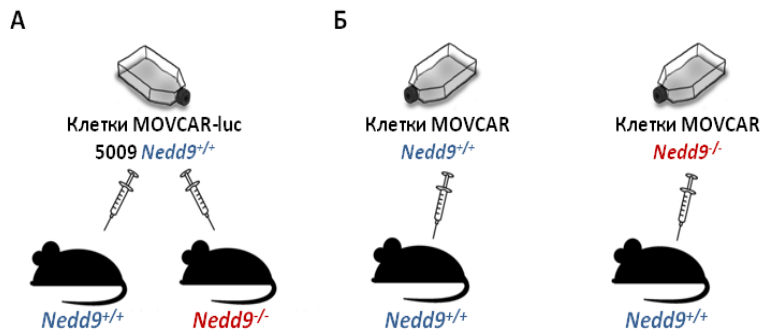


Рис. 1. Схема ортотопических имплантаций с использованием *Tag-low* мышей. Пояснение в тексте.

Анализ влияния делеции гена *Nedd9* в первичной опухоли на развитие ЭРЯ. Для исследования влияния делеции *Nedd9* в первичной опухоли на развитие ЭРЯ, *Nedd9*^{+/+} и *Nedd9*^{-/-} клетки MOVCAR имплантировали в *Nedd9*^{+/+} мышей (рис. 1Б). Имплантации по данной схеме провели в трёх повторностях, в каждой повторности использовали новые пары *Nedd9*^{+/+} и *Nedd9*^{-/-} MOVCAR клеток.

Анализ экспрессии и фосфорилирования белков методом Вестерн-блот. Использовали клеточные и тканевые лизаты, полученные соответственно, при помощи лизисных растворов T-Per и M-Per (Sigma-Aldrich, США) с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз. Лизаты разгоняли в градиентном полиакриламидном геле и переносили на поливинилиденфторидную мембрану методом электроблоттинга. Далее мембрану блокировали, инкубировали в растворах первичных и вторичных антител и визуализировали при помощи фотографической плёнки. Полученные изображения оцифровывали и квантифицировали на компьютерной программе ImageJ 2.0.

Анализ внутриклеточной локализации белков. Применяли иммунофлюоресцентное окрашивание. Клетки растили на стерильных стеклянных предметных стёклах, фиксировали в параформальдегиде, пермеабилizировали метанолом и окрашивали антителами к винкулину (маркер фокальных контактов, Santa Cruz, США), NEDD9 (Abcam, США), pFAK^{Y397}, pSrc^{Y416} и pSTAT3^{Y705} (CST, США). Для визуализации ядер, клетки инкубировали в растворе DAPI (Thermo Scientific). Препараты накрывали покровными стёклами и фотографировали при помощи флюоресцентного микроскопа.

Исследование образования белок-белковых комплексов методом коиммунопреципитации. Белковые комплексы осаждали при помощи магнитных бусин Dynabeads Protein A (Invitrogen) по инструкции производителя, с использованием моноклональных антител, специфичных к pSTAT3^{Y705}, NEDD9, pFAK^{Y397} или pSrc^{Y527}. В качестве отрицательного и положительного контролей использовали элюэнты, полученные, соответственно, с бусин инкубированных в растворе IgG и неосаждённый клеточный лизат.

Полногеномный скрининг экспрессии мРНК в спонтанных опухолях TAg-мышей. Выделение тотальной РНК из образцов опухолей TAg-мышей, контроль её качества а также последующую амплификацию и флуоресцентное мечение проводили при помощи следующих наборов, соответственно: RNeasy Mini Kit (Qiagen, США), Agilent Bioanalyzer RNA (Agilent, США) и RNA input linear amplification kit (Agilent), по инструкциям производителей. Меченые кРНК гибридизировали на микроплашках Agilent Mouse Whole Genome Microarray 4x44K (Agilent). Исходные данные по всем образцам корректировали по фоновому сигналу и нормализовали по квантилям. Данные обрабатывали на компьютерной программе Bioconductor (Smyth, 2004 Gentleman *et. al.*, 2004). За критерий различия приняли двукратное изменение генной экспрессии при $p < 0.001$ и false discovery rate равном 5%. Экспрессию выбранных генов проверяли при помощи количественной обратной-транскрипционной полимеразной цепной реакции (кОТ-ПЦР), результаты которой анализировали по методу $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Статистический анализ. Статистический анализ данных проводили при помощи компьютерной программы GraphPad Prism 5.0 (Graphpad Software Inc., США). Полученные результаты представлены средними значениями (M), и стандартной ошибкой (SEM). Группы сравнивали, с использованием непараметрического двустороннего t-критерия Уилкоксона. Статистически достоверным принималось различие при значении $p < 0,05$. На графиках статистическую значимость обозначали следующим образом: * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p < 0,001$, **** – $p < 0,0001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние системной делеции Nedd9 на развитие спонтанных опухолей яичников

Для получения общего представления об участии NEDD9 в развитии ЭРЯ, скрестили мышей линий *TAg* и *Nedd9^{-/-}*, и сравнили развитие спонтанных ОЯ у *TAg;Nedd9^{-/-}* и *TAg;Nedd9^{+/+}* мышей. Системная потеря экспрессии *Nedd9* привела к снижению скорости роста ОЯ у *TAg*-мышей (рис. 2А). Кроме того, опухоли *Nedd9^{-/-}* мышей были менее агрессивными, о чём говорила тенденция к понижению количества перитонеальных метастатических узелков ($3,0 \pm 1,6$ против $4,7 \pm 1,5$; рис. 2Б) и частоты развития опухолевых асцитов (48% против 70%) у *TAg;Nedd9^{-/-}* мышей относительно мышей контрольной группы (рис. 2В).

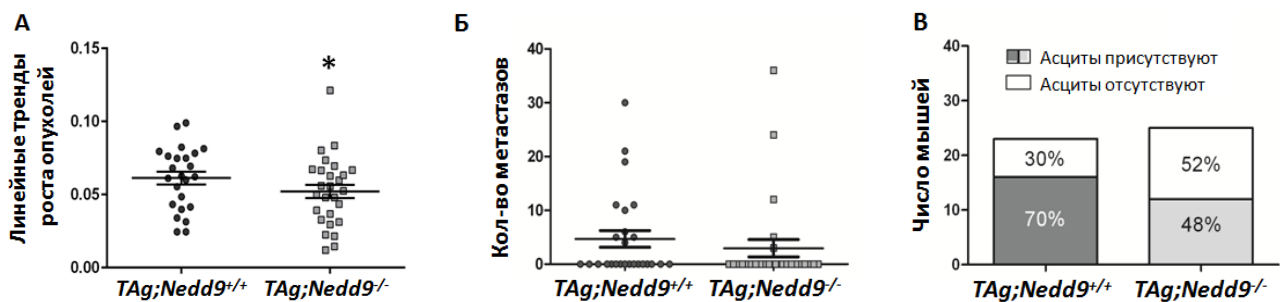
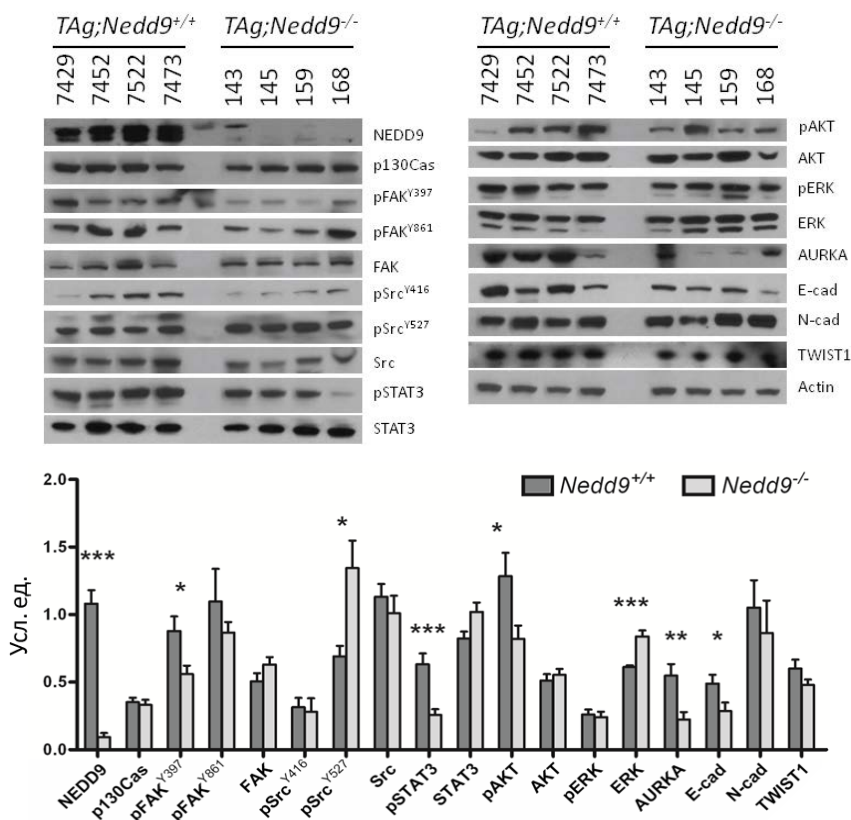


Рис. 2. **А:** Значения линейных трендов графиков роста спонтанных опухолей яичников, **Б:** количество метастатических узелков и **В:** частота развития опухолевых асцитов в *TAg;Nedd9^{+/+}* и *TAg;Nedd9^{-/-}* мышах.

Влияние системной делеции гена *Nedd9* на молекулярную сигнализацию в опухолях *TAg*-мышей

Для исследования молекулярных изменений в ответ на делецию гена *Nedd9*, проанализировали экспрессию и фосфорилирование ряда онкогенных белков в опухолях *TAg;Nedd9^{-/-}* и *TAg;Nedd9^{+/+}* мышей (рис.3). В *Nedd9^{-/-}* опухолях было



обнаружено снижение фосфорилирования киназы фокальных контактов FAK в остатках тирозина (Tyr) Tyr 397 и, на уровне тенденции, Tyr 861, что

Рис 3. Влияние системной делеции *Nedd9* на экспрессию и фосфорилирование онкогенных белков в спонтанных ОЯ *TAg*-мышей. Образцы Вестерн-блотов

(сверху) и данные количественного анализа (снизу)

указывало на понижение активации этого белка, важного для интегриновой сигнализации и клеточной миграции. Изменений в киназной активности другого участника интегриновой сигнализации, Src-киназы, не наблюдалось, судя по отсутствию изменений фосфорилирования в Tyr 416. Однако фосфорилирование Src в Tyr 527 в *Nedd9*^{-/-} опухолях было повышено, что говорило о принятии данной киназой неактивной конформации. Судя по снижению фосфорилирования в Tyr 705 и в остатке серина (Ser) 473, соответственно, делеция *Nedd9* также привела к понижению активности транскрипционного фактора STAT3 и серин-треониновой киназы AKT1, принимающей участие в регуляции апоптоза. В *Nedd9*^{-/-} опухолях было обнаружено повышение общей экспрессии митогенных серин-треониновых киназ ERK1/2, однако изменений в фосфорилировании ERK1/2 по остаткам треонина (Thr) 202/Tyr 204, которое приводит к активации данных киназ, выявлено не было. Кроме того, в *Nedd9*^{-/-} опухолях наблюдалось понижение экспрессии митотической серин-треониновой киназы Aurora A и белка межклеточных контактов E-кадгерина. *Nedd9*-зависимых изменений в экспрессии N-кадгерина и транскрипционного фактора TWIST1, регулирующего транскрипцию кадгеринов, обнаружено не было.

Влияние делеции Nedd9 в микроокружении опухоли на развитие ЭРЯ

Неоднократно показано, что белок NEDD9 участвует в миграции некоторых популяций лимфоцитов у мышей (Shagisultanova *et.al.*, 2015). В то же время компоненты иммунного микроокружения, как врождённого, так и адаптивного, могут вносить вклад в развитие ЭРЯ (Robinson-Smith *et al.*, 2007 Gajewski *et al.*, 2013). Наряду с обнаруженными изменениями в онкогенной сигнализации, понижение агрессивности ЭРЯ у *Nedd9*^{-/-} TAg-мышей могло быть связано и с модуляцией мигративности клеток иммунной системы. Для исследования этой гипотезы мы смоделировали делецию *Nedd9* в микроокружении опухоли, при сохранении экспрессии данного гена первичными опухолями. Из 30 мышей TAg-low каждого генотипа, в которых в ходе трёх независимых экспериментов вживили аллогraftы (клетки MOVCAR 5009), выжили в общей сложности 27 TAg-low;*Nedd9*^{-/-} и 29 TAg-low;*Nedd9*^{+/+} животных. Мыши реципиенты обоих генотипов достигли критерия для эвтаназии за равные промежутки времени (52.8 ± 9.8 и 53.1 ± 9.6 дня, соответственно). Гистологически аллогraftные опухоли были близки к спонтанным, образующимся в TAg-мышам. При этом рост аллогraftов в TAg-low;*Nedd9*^{-/-}

реципиентах шёл несколько быстрее (рис. 4А), а число обнаруженных перитонеальных узелков было в среднем выше, чем в животных контрольной группы (соответственно, $76,5 \pm 12,4$ и $53,3 \pm 7,0$; рис. 4Б). Кроме того, у *TAg-low;Nedd9^{-/-}* реципиентов опухоли несколько чаще сопровождались асцитами (рис. 4В), причём в среднем большего объёма, чем у *TAg-low;Nedd9^{+/+}* мышей (соответственно, $3,3 \pm 0,9$ мл и $2,3 \pm 0,6$ мл; не показано). Тем не менее, ни одно из наблюдавшихся различий не достигло статистической значимости в рамках данного эксперимента.

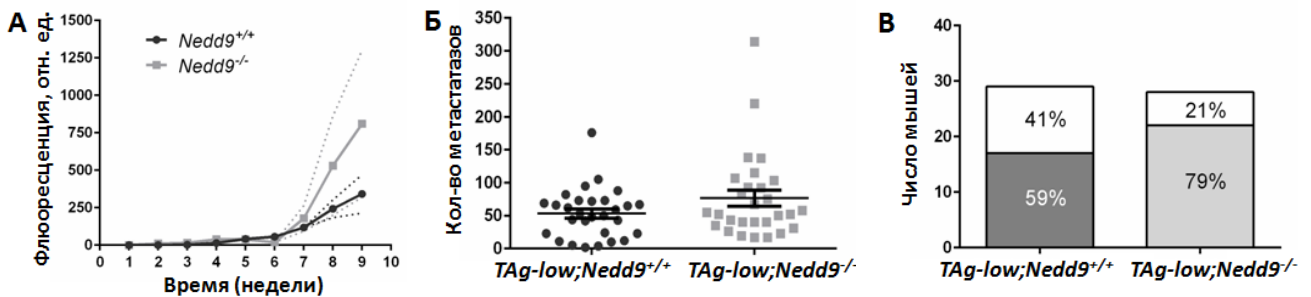


Рис. 4. **А:** графики роста аллогraftов в *TAg-low;Nedd9^{+/+}* и *TAg-low;Nedd9^{-/-}* мышах; отобразно отношение флюоресценции в данную неделю к таковой в первую неделю; **Б:** количество метастатических узелков в *TAg-low;Nedd9^{+/+}* и *TAg-low;Nedd9^{-/-}* реципиентах; **В:** частота мышей-реципиентов, развивших асциты.

Влияние делеции *Nedd9* в микроокружении опухоли на молекулярную сигнализацию в опухолях яичников

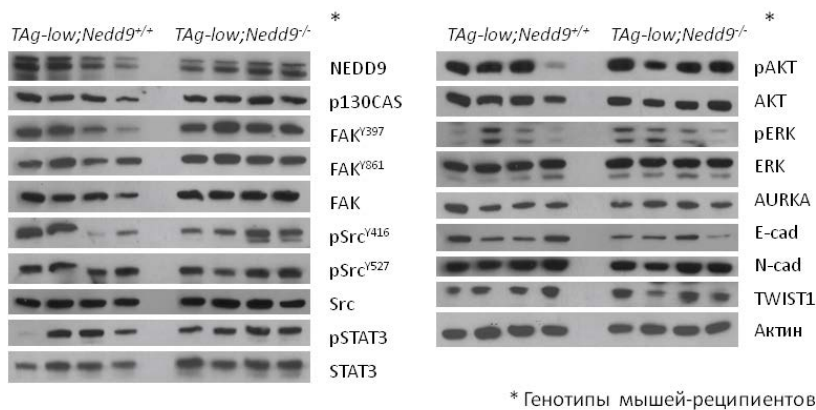


Рис. 5. Влияние делеции *Nedd9* в микроокружении опухоли на протеиновую экспрессию в ОЯ, примеры Вестерн-блотов. Данные количественного анализа не приведены.

Аллографтные опухоли, выделенные из *TAg-low;Nedd9^{+/+}* и *TAg-low;Nedd9^{-/-}* мышей ($n=4$ для каждого генотипа), подвергли анализу экспрессии того же ряда белков, который исследовали в спонтанных опухолях *TAg*-мышей. Для большинства из исследованных белков *NEDD9*-зависимых различий в экспрессии и активации не обнаружено (рис. 5). В то же время в аллогraftах *TAg-low;Nedd9^{-/-}* мышей была повышена общая экспрессия FAK (статистически достоверно) и обнаружена тенденция к повышению фосфорилирования Src, АКТ и ERK.

Влияние делеции гена *Nedd9* на инфильтративность клеток системы иммунитета

Далее при помощи проточной цитометрии непосредственно исследовали влияние делеции *Nedd9* в микроокружении опухоли на присутствие иммунных клеток в тканях *TAg-low;Nedd9^{-/-}* и *Tag-low;Nedd9^{+/+}* мышей (n=6 для каждого генотипа). В перитонеальных экссудатах *TAg-low;Nedd9^{-/-}* мышей количество NK-клеток было в среднем ниже, чем в животных контрольной группы (рис. 6); вероятно, с этим связана описанная выше тенденция к повышенной агрессивности аллографтов в *TAg-low;Nedd9^{-/-}* реципиентах. Так, ранее Rowley с коллегами показали, что блокировка NK1.1⁺ лимфоцитов положительно влияет на развитие аллографтных опухолей ОЯ в различий между другими проанализированными клеточными популяциями *TAg-low;Nedd9^{-/-}* и *Tag-low;Nedd9^{+/+}* мышей (не показано).

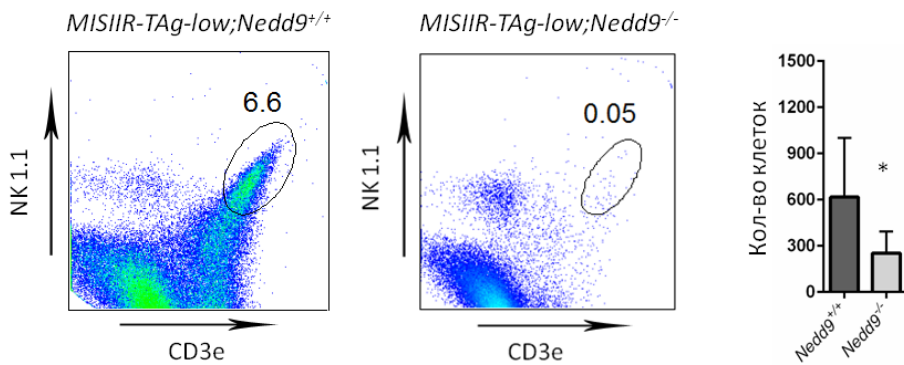


Рис. 6. Присутствие NK-клеток в перитонеальном экссудате мышей реципиентов *Nedd9^{+/+}* аллографтов. На точковых графиках приведены примеры полученных результатов; указано процентное соотношение NK-

клеток в общей популяции $CD45^{+}$ -клеток. На гистограмме показаны средние значения количества NK-клеток в перитонеальных смывах данного генотипа мышей-реципиентов.

Влияние делеции *Nedd9* на агрессивность клеток ЭРЯ *in vitro*

Обнаружив, что экспрессия NEDD9 в микроокружении опухоли незначительно влияет на рост и распространение ЭРЯ, мы предположили, что в основе замедления роста и снижения агрессивности спонтанных опухолей *TAg;Nedd9^{-/-}* мышей лежали внутриклеточные изменения, последовавшие за потерей NEDD9. Исследование этого предположения начали с серии *in vitro* экспериментов, в которых рассмотрели ряд клеточных фенотипов, фундаментальных для развития и распространения злокачественной опухоли. Эксперименты не выявили различий между *Nedd9^{+/+}* и *Nedd9^{-/-}* клетками MOVCAR в адгезии и пролиферации (не показано). В то же время *Nedd9^{-/-}* клетки демонстрировали пониженный хемотаксис к ФБС в камерах Бойдена (рис. 7). Те же *Nedd9^{-/-}*-клетки, однако, были в среднем более мигративны, чем *Nedd9^{+/+}*-клетки, в контрольных лунках без градиента ФБС ($p < 0.001$, не показано).

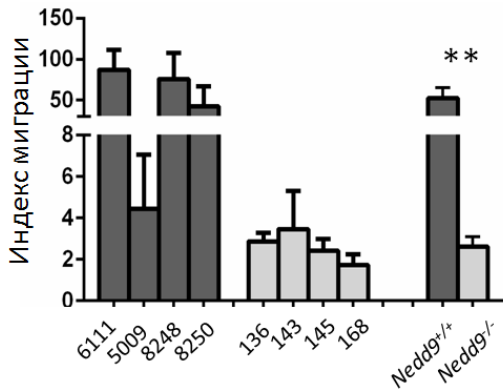


Рис. 7. Миграция клеток MOVCAR в системе xCELLigence в градиенте ФБС. Тёмным цветом показаны значения для *Nedd9*^{+/+}, светлыми – для *Nedd9*^{-/-}-клеточных линий. В правой части гистограммы приведены средние значения для всех клеточных линий данного генотипа.

Анализ инвазии в Матригеле не показал достоверных различий между клетками разных генотипов, однако, как и при анализе миграции, была замечена повышенная инвазивность *Nedd9*^{-/-} клеток в контрольных лунках ($p < 0.01$, не показано). Ускоренный переход *Nedd9*^{-/-}-клеток MOVCAR из верхнего цилиндра камеры Бойдена в нижний в условиях отсутствия градиента хемоаттрактанта мог указывать на то, что экспрессия NEDD9 у отрицательно влияет на спонтанную мигративность клеток ЭРЯ. Данное предположение подтвердилось наблюдением повышенной, относительно контрольных клеток, мигративности в монослое при моделировании

раны как у *Nedd9*^{-/-} клеток MOVCAR (не показано, $p < 0.05$), так и *NEDD9*^{+/+} клеточных линий ЭРЯ человека и мыши, у которых при помощи кшРНК нарушали экспрессию гена *NEDD9* (не показано, $p < 0.05$ для всех использованных клеточных линий). Таким образом, экспрессия NEDD9, с одной стороны, способствовала хемотактической миграции клеток ЭРЯ, с другой же – понижала спонтанную мигративность клеток, что согласовывалось с литературными данными: показано, что NEDD9 стабилизирует ФК, вследствие чего *Nedd9*^{-/-} мышинные эмбриональные фибробласты мигрируют быстрее контроля в условиях двумерного роста, и медленнее – в условиях роста в трёхмерном матриксе (Zhong *et. al.*, 2012).

Влияние внутриклеточной делеции *Nedd9* на агрессивность ЭРЯ *in vivo*

Для того, чтобы провести *in vivo* исследование роли внутриклеточной экспрессии NEDD9 в развитии и метастазировании ЭРЯ, смоделировали делецию гена *Nedd9* в первичной опухоли в контексте *Nedd9*^{+/+} микроокружения. В анализ включены данные трёх независимых экспериментов, в каждом из которых использовались разные пары *Nedd9*^{+/+} и *Nedd9*^{-/-} клеточных линий MOVCAR. Клетки каждой из линий были имплантированы в 10 мышей; до окончания эксперимента выжили 26 мышей с *Nedd9*^{+/+} и 25 мышей с *Nedd9*^{-/-} аллографтами. На момент эвтаназии мыши обеих групп в среднем имели опухоли равных объемов (не показано). *Nedd9*^{-/-} аллографты росли значительно медленнее контрольных (102 ± 7

дня и 74 ± 4 дней, соответственно; рис. 10). Распространение *Nedd9*^{-/-} аллографтов также было замедлено относительно *Nedd9*^{+/+} аллографтов (30.7 ± 4.2 метастатических узелка против 69.0 ± 3.7 , соответственно; рис. 10). Кроме того, делеция *Nedd9* в первичных опухолях привела к уменьшению частоты появления асцитов и их среднего объёма (рис. 10 Г и Д).

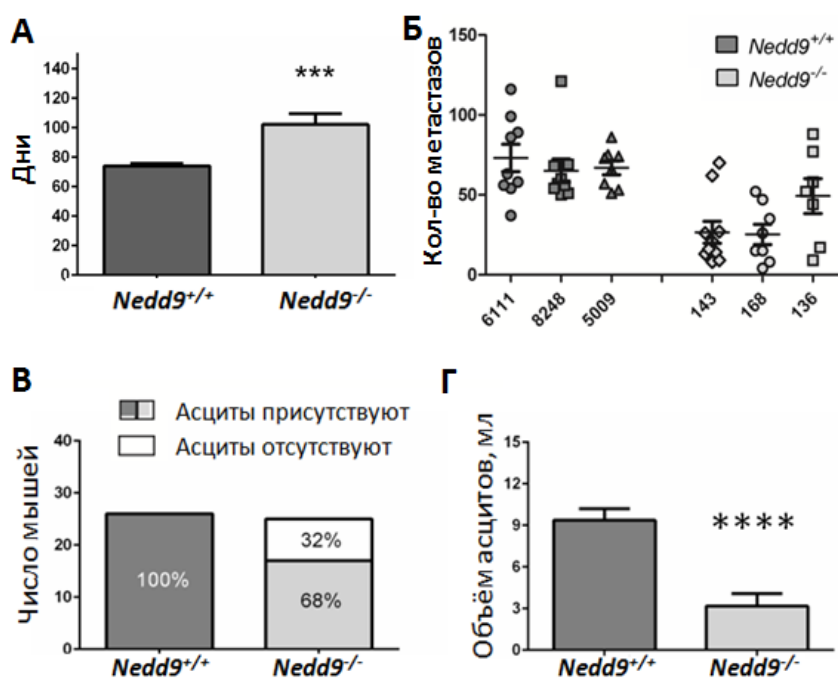


Рис. 8. Исследование влияния делеции *Nedd9* в первичной опухоли на развитие ЭРЯ. **А:** средняя продолжительность роста аллографтов; **Б:** количество метастатических узелков, **В:** частота развития и **Г:** средний объем асцитов в мышечных реципиентах *Nedd9*^{+/+} и *Nedd9*^{-/-} аллографтов.

Влияние делеции *Nedd9* в первичных опухолях на их молекулярную сигнализацию

Очевидно, что наблюдавшееся замедление роста и метастазирования *Nedd9*^{-/-} аллографтов было связано с изменениями в их молекулярной сигнализации. Для биохимического анализа из каждой серии имплантаций аллографтов использовали по четыре *Nedd9*^{+/+} и *Nedd9*^{-/-} опухоли (рис.9). В целом, картина экспрессии и активации онкогенных белков в *Nedd9*^{-/-} аллографтах напоминала таковую в опухолях *Nedd9*^{-/-} TAg-мышей. Так же как и в спонтанных опухолях, в *Nedd9*^{-/-} аллографтах наблюдалось снижение фосфорилирования FAK по Тир 397 и 861, а также тенденция к понижению фосфорилирования Src в Тир 416 и повышенное фосфорилирование Src в Тир 527. *Nedd9*^{-/-} аллографты продемонстрировали значимое понижение общей экспрессии FAK и STAT3, а также выраженную тенденцию к понижению общей экспрессии AURKA и фосфорилирования АКТ. Кроме того, в *Nedd9*^{-/-} опухолях обнаружено статистически достоверное снижение экспрессии Е-кадгерина при отсутствии изменений в уровнях N-кадгерина и TWIST1. Судя по данным Вестерн-блот анализа, NEDD9 не способствует переключению кадгеринов и ЭМП в ОЯ. Кроме того, судя по нашим данным, эффект делеции *Nedd9* на агрессивность клеток ЭРЯ

зависит от условий их роста и не проявляется в двумерной культуре в той мере, в которой его можно наблюдать *in vivo*.

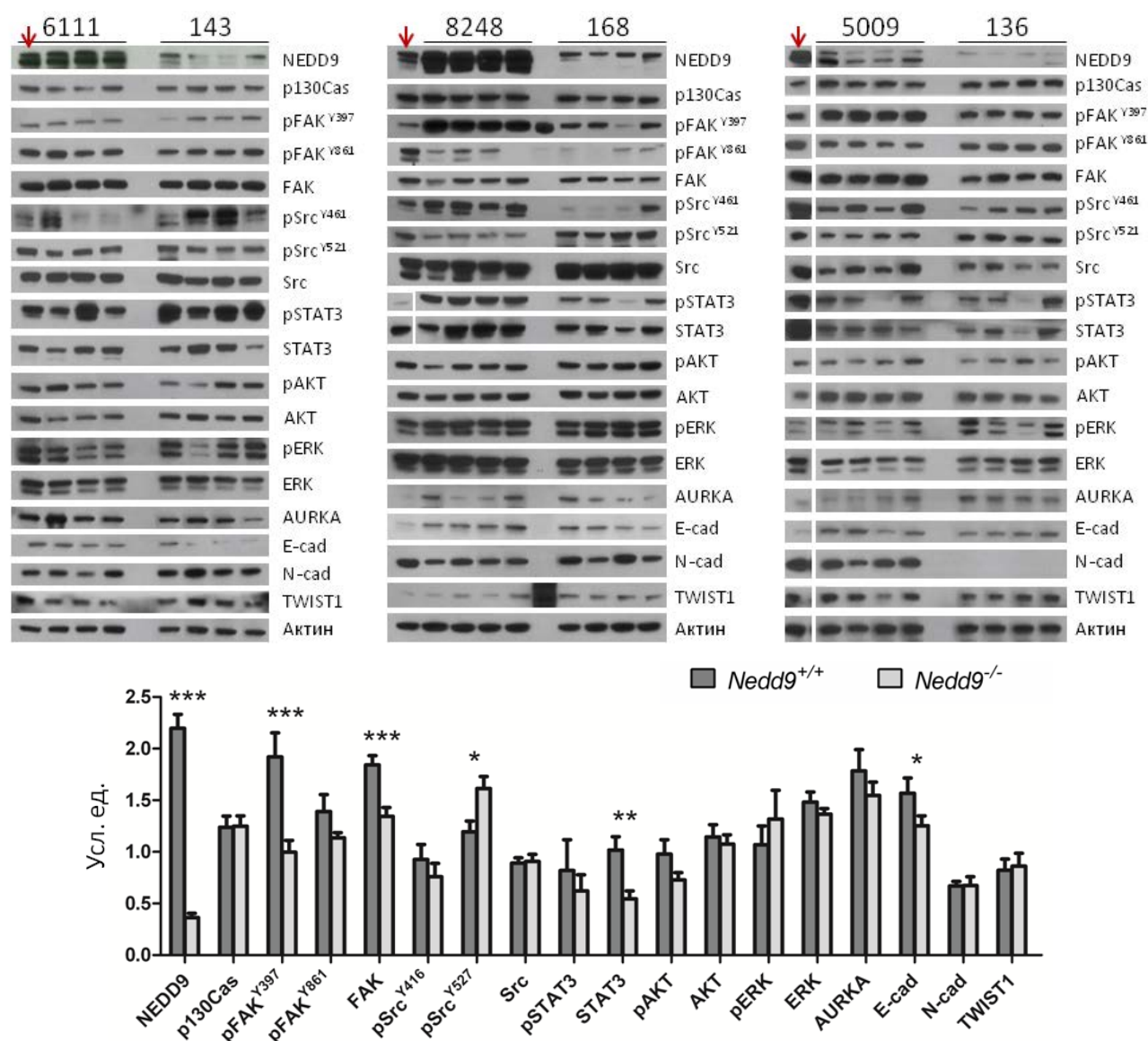


Рис. 9. Анализ молекулярных изменений в ответ на делецию *Nedd9* в первичной опухоли. Сверху: примеры Вестерн-блотов. Для нормализации значений белковой экспрессии в разных опухолях использовали лизат одного из аллогraftов из первой имплантации (отмечен красной стрелкой). Снизу: данные количественного анализа. Показаны усреднённые значения экспрессии для всех трёх пар аллогraftов. Небольшая экспрессия *NEDD9*, наблюдающаяся в некоторых *Nedd9*^{-/-} аллогraftах, объясняется присутствием в опухоли *Nedd9*^{+/+} стромального компонента.

Регуляция активации и локализации STAT3 в фокальных контактах клеток ЭРЯ

Делеция гена *Nedd9* привела к понижению содержания активированной формы транскрипционного фактора STAT3 (pSTAT3) в опухолях TAg-мышей (рис.3). Ранее было сообщено о том, что киназы FAK и Src принимают участие в локализации pSTAT3 в фокальных контактах (Silver *et al.*, 2004). Для исследования возможной роли NEDD9 в данном процессе при помощи соответствующих кш- и киРНК, провели

нокдаун генов *Nedd9*, *Stat3*, *Fak* и *Src* в клетках MOVCAR 5009. Иммунофлюоресцентное окрашивание клеток соответствующими антителами показало присутствие pSTAT3 как в ядрах, так и в областях фокальных контактов клеток (рис. 12А, верхний ряд). При этом в ответ на нокдаун *Nedd9* наблюдали понижение уровня pSTAT3 в клетках вообще и у ФК в частности. То же наблюдали и в ответ на нокдаун *Fak*, но не *Src*.

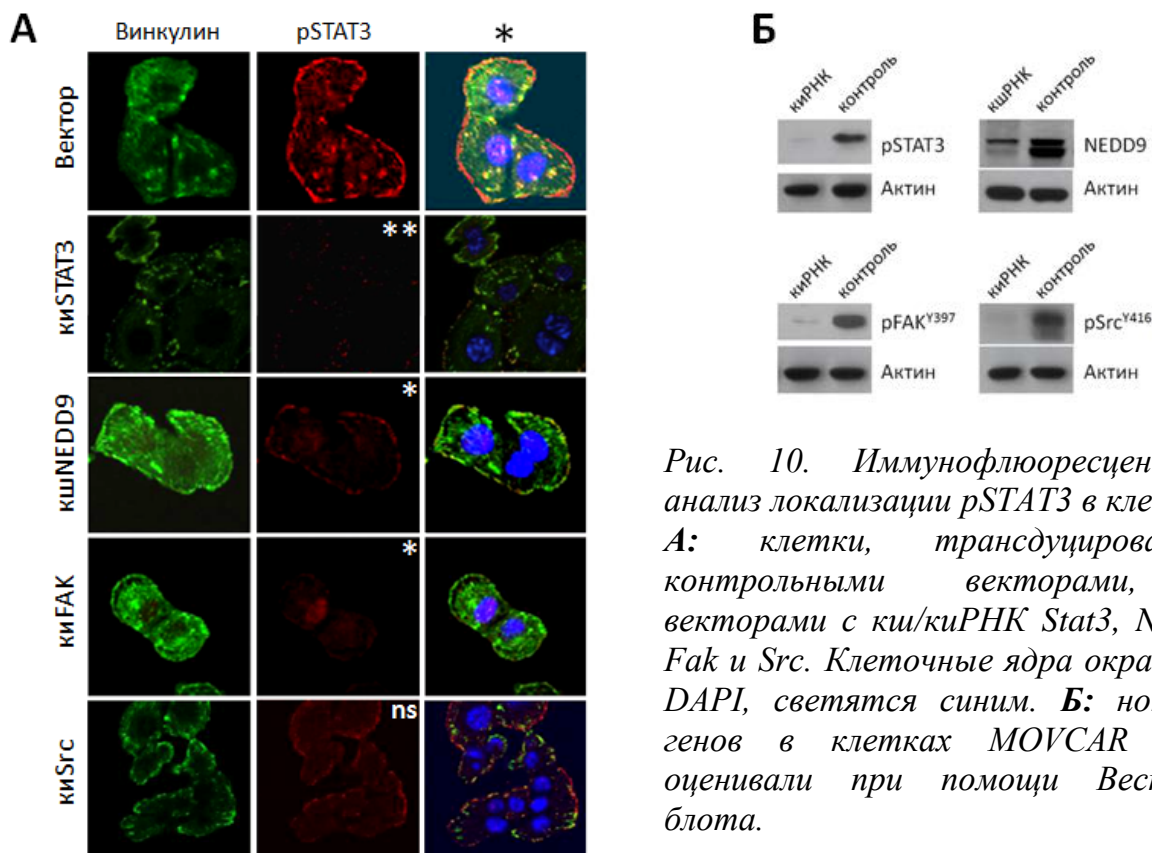


Рис. 10. Иммунофлюоресцентный анализ локализации pSTAT3 в клетках. **А:** клетки, трансдуцированные контрольными векторами, и векторами с ки/киРНК *Stat3*, *Nedd9*, *Fak* и *Src*. Клеточные ядра окрашены DAPI, светятся синим. **Б:** нокдаун генов в клетках MOVCAR 5009 оценивали при помощи Вестерн-блота.

Исследование образования комплекса NEDD9-pFAK-pSTAT3

Для более детального понимания участия NEDD9 и FAK в активации STAT3, исследовали образование комплекса между этими белками. Активированная форма STAT3 (pSTAT3^{Y705}) осаждалась в комплексе как с NEDD9, так и с активированной формой FAK (pFAK^{Y397}). Полученные данные позволяют предположить, что в фокальных контактах клеток ЭРЯ NEDD9 служит скаффолдом для активации STAT3 киназой FAK.

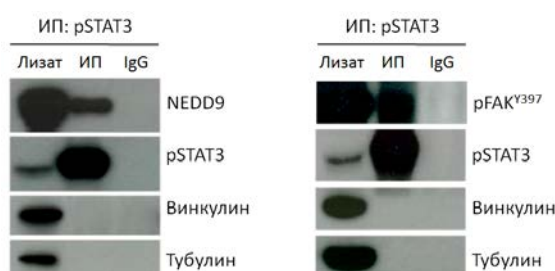


Рис. 11. Коиммунопреципитация активированной формы STAT3 с NEDD9 (слева) и активированной формой FAK (справа). ИП – иммунопреципитация; Лизат – положительный контроль; IgG – отрицательный контроль

Влияние делеции *Nedd9* на генную экспрессию в опухолях TAg-мышей

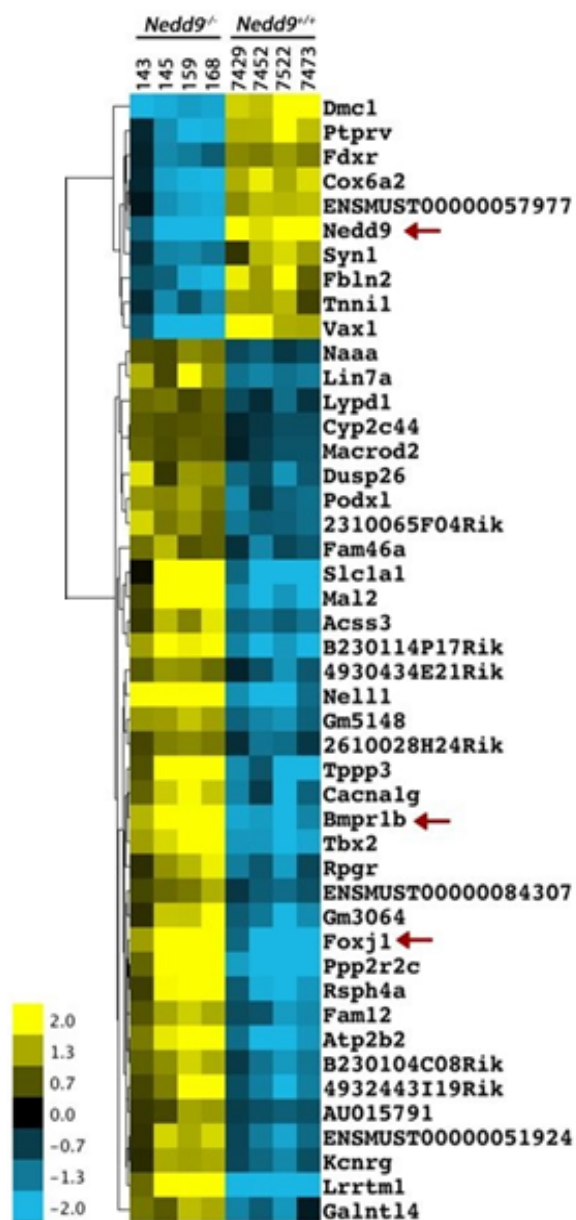


Рис. 12. Экспрессия мРНК генов, наиболее различавшаяся в опухолях TAG;Nedd9^{+/+} и TAG;Nedd9^{-/-} мышей.

Строение белка NEDD9, как и других скаффолд-протеинов, позволяет ему принимать участие во множестве молекулярных процессов. Вестерн-блот анализа позволил исследовать некоторые из молекулярных взаимодействий NEDD9, обнаруженных ранее в других видах опухолей, в контексте ЭРЯ. Для более широкой оценки молекулярных взаимодействий NEDD9 в контексте рака яичников был проведён полногеномный скрининг экспрессии мРНК в спонтанных опухолях TAG;Nedd9^{+/+} и TAG;Nedd9^{-/-} мышей (n=4 для каждого генотипа). Согласно выбранным критериям, 14 кодирующих последовательностей с неописанными функциями и 32 известных гена наиболее различались по экспрессии мРНК (наблюдалась как прямая, так и обратная регуляция со стороны Nedd9). Среди последних имелись гены, участвующие в

эмбриональном развитии, функционировании нервной системы, работе мышц, остеогенезе, везикулярном транспорте, клеточном делении и миграции, а также общем метаболизме (рис. 12). Вероятно, в будущем для некоторых из этих генов, будут показаны роли в развитии ЭРЯ. С другой стороны, полученные данные указывают на новые потенциальные направления исследований роли NEDD9 в норме и патологии. В числе генов, экспрессия которых значительно повысилась в Nedd9^{-/-} опухолях TAG-мышей, были ген рецептора костного морфогенетического белка 7 *Bmpr1b* и ген транскрипционного фактора *Foxj1*. Одноимённые продукты этих генов ассоциированы, соответственно, с развитием предопухолевых состояний и опухолей яичников (Edson *et al.*, 2010, Sui *et al.*, 2013), поэтому они были выбраны для

дальнейшего анализа. На генном уровне обратная зависимость экспрессии *Bmpr1b* *Foxj1* от *Nedd9* подтверждались кОТ-ПЦР ($p < 0,05$ для обоих генов, не показано), однако на белковом уровне была обнаружена только для FOXJ1. ($p < 0,05$, не показано).

Участие NEDD9 в регуляции экспрессии генов, регулируемых FOXJ1

Далее исследовали влияние делеции *Nedd9* на экспрессию генов, регулируемых FOXJ1. Для этого объединили два опубликованных списка транскрипционных мишеней FOXJ1 (Didon *et al.*, 2013, Choksi *et al.*, 2014) и выбрали ряд повторяющихся генов, экспрессию которых в опухолях *TAg;Nedd9^{+/+}* и *TAg;Nedd9^{-/-}* ($n=4$ для каждого генотипа) оценили при помощи кОТ-ПЦР. Экспрессия всех рассмотренных генов, регулируемых FOXJ1, была значимо повышена в опухолях *TAg;Nedd9^{-/-}* (рис. 16).

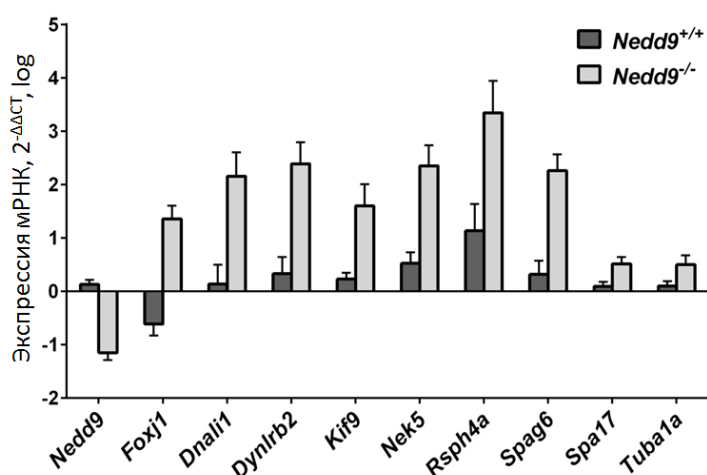


Рис. 13. Экспрессия генов, регулируемых фактором транскрипции FOXJ1, в опухолях мышей *TAg;Nedd9^{+/+}* и *TAg;Nedd9^{-/-}*. Приведены средние логарифмированные значения экспрессии по каждому генотипу. Во всех случаях $p < 0.05$.

Краткое описание функций белков, кодируемых проанализированными генами, приведено в таблице 1. Среди них особенно интересны гены, кодирующие структурные компоненты подвижных ресничек и жгутиков: *Dnal1*, *Dynlrb2*, *Kif9*, *Rsph4a*, *Spag6* и *Tuba1a*. NEDD9 участвует в регуляции работы первичных ресничек, активируя тубулиновую деацетилазу HDAC6 через киназу AURKA (Pugacheva *et al.*, 2007). Полученные нами данные, позволяют предположить до настоящего времени неизвестную роль NEDD9 в регуляции и подвижных ресничек.

Таблица 1. Экспрессия генов, регулируемых транскрипционным фактором FOXJ в опухолях *TAg;Nedd9^{+/+}* и *TAg;Nedd9^{-/-}*. *- Соотношение экспрессии в *Nedd9^{-/-}* и *Nedd9^{+/+}* опухолях. Ссылки: (1) – NCBI, 2016, (2) – UniProt, 2016

| Символ | * | Краткая информация о белковом продукте |
|----------------|------|--|
| <i>Dnal1</i> | 85.0 | Продукт гомолога гена, кодирующего внутренние динеиновые ручки у <i>Chlamydomonas</i> . Участвует в биении двигательных ресничек (1) |
| <i>Dynlrb2</i> | 92.3 | Некаталитический структурный компонент комплекса цитоплазматического динеина 1 (1) |

Таблица 1. Продолжение

| | | |
|----------------|------|--|
| <i>Kif9</i> | 40.8 | Входит в суперсемейство моторных белков кинезинов (2) |
| <i>Nek5</i> | 90.9 | Обладает серин-треониновой активностью. Экспрессия достигает пика в G2 фазе, что говорит об его участии в клеточном делении (2) |
| <i>Rsph4a</i> | 117 | Входит в состав головки радиальной спицы, компонента аксонемы двигательных ресничек. Является скаффолдом для передачи сигнала от центральной пары микротрубочек к динеинам. Мутации в гене <i>Rsph4a</i> приводят к цилиарной дискинезии (1) |
| <i>Spa17</i> | 2.8 | Находится на поверхности клеток. Может участвовать в межклеточной адгезии, миграции и метастазировании иммунных клеток (1) |
| <i>Spag6</i> | 73.5 | Участвует в биении жгутика сперматозоидов, возможна связь с бесплодием у мужчин (1) |
| <i>Tubal1a</i> | 2.8 | Альфа-тубулин, один из структурных компонентов микротрубочек (1) |

ВЫВОДЫ

1. Экспрессия NEDD9 в первичных опухолях положительно влияет на скорость роста опухолей, их метастазирование и вероятность развития опухолевых асцитов при карциноме яичников. Это ассоциировано с повышением экспрессии и/или активации онкогенных белков, повышающих мигративность (FAK, Src), пролиферативность (Aurora A киназа) и жизнеспособность (AKT1) опухолевых клеток;
2. Экспрессия NEDD9 в клеточном микроокружении приводит к увеличению перитонеальной инфильтрации естественных киллеров, но не влияет на развитие, распространение и онкогенную сигнализацию в эпителиальных опухолях яичников;
3. NEDD9 и FAK связываются с транскрипционным фактором STAT3 и регулируют его активацию, а также регулируют локализацию активированной формы STAT3 в фокальных контактах клеток карциномы яичников;
4. В эпителиальных опухолях яичников NEDD9 регулирует экспрессию обширного ряда генов, в том числе транскрипционного фактора FOXJ1, а также белкового продукта последнего, таким образом участвуя в регуляции транскрипции генов-мишеней FOXJ1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей диссертационной работе исследовали механизмы участия скаффолд-протеина NEDD9 в развитии эпителиального рака яичников. На мышинных моделях ЭРЯ мы показали, что делеция гена *Nedd9* приводит к снижению роста и агрессивности опухолей яичника и понижению экспрессии и активации белков,

участвующих в миграции и инвазии (FAK, Src), выживании (AKT1) и делении (Aurora A киназа) трансформированных клеток, что согласуется с рядом более ранних исследований на различных видах злокачественных опухолей. При этом критическим действием обладала потеря NEDD9 в первичной опухоли. Делеция же *Nedd9* в клеточном микроокружении опухоли не приводила к статистически значимым изменениям в биологии опухолей. В работе впервые было показано, что в клетках ЭРЯ белок NEDD9, вместе с киназой фокальных контактов FAK, связывается с транскрипционным фактором STAT3, что приводило к активации STAT3 и его аккумуляции в фокальных контактах. Кроме того, в результате системной делеции *Nedd9*, в опухолях яичников изменилась экспрессия ряда генов, участвующих в обширном спектре процессов, в частности, регуляции сборки и работы подвижных ресничек. Последнее наблюдение дало нам основание предположить ранее неизвестные роли NEDD9 в работе этих органелл. Наши данные представляют как фундаментальный, так и практический интерес, в частности, указывают на возможность использования NEDD9 в качестве маркера для анализа биоптатного материала с целью прогнозирования течения эпителиального рака яичника. Данные о транскрипционной регуляции ряда генов со стороны NEDD9 открывают возможности для новых направлений исследований молекулярной сигнализации в эпителиальных опухолях яичников.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Gritsina, G. Targeted blockade of JAK/STAT3 signaling inhibits ovarian carcinoma growth / G. Gritsina, F. Xiao, S. W. O'Brien, **R. Gabbasov**, M.A. Maglaty, R.H. Xu, *et al.* // Molecular Cancer Therapeutics. – 2015. – Vol.14, № 4 - P. 1035-1047
2. Shagisultanova, E. Preclinical and clinical studies of the NEDD9 scaffold protein in cancer and other diseases / E. Shagisultanova, A. V. Gaponova, **R. Gabbasov**, E. Nicolas and E. A. Golemis // Gene. – 2015. – Vol. 567, №1 - P. 1-11
3. **Габбасов Р.Т.** Влияние экспрессии NEDD9 в первичной опухоли и опухолевом микроокружении на развитие эпителиального рака яичников / Р. Т. Габбасов, Л. Э. Бикль, Ш. У. О'Брайн, С. Литвин, С. Сио, Э.А. Големис, Э. Бабынин, Д. С. Конолли // Материалы II международной конференции молодых учёных: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. Новосибирск, Кольцово. 2015 – С. 162 – 163
4. **Габбасов, Р.Т.** Важность контекста: экспрессия NEDD9 способствует развитию карциномы яичников *in vivo*, однако подавляет агрессивность раковых клеток *in vitro* / Р. Т. Габбасов, Л. Бикль, Ш. О'Брайн, С. Литвин, С. Сио, Э. Големис, Э.В. Бабынин и Д. Конолли // Вестник РГМУ: материалы X Международной (XIX

Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. Москва 2015. - №2 - С. 463

5. **Габбасов Р.Т.** Влияние вне- и внутриопухолевой экспрессии NEDD9 на развитие эпителиального рака яичников / Р. Т. Габбасов, Л. Э. Бикль, Ш. У. О'Брайн, С. Литвин, С. Сео, Э.А. Големис и Д. С. Конолли // Материалы IV международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань, 2014. – С. 217.
6. **Gabbasov, R.** NEDD9 expression promotes epithelial ovarian cancer growth and dissemination / R. Gabbasov, L.E. Bickel, S.W. O'Brien, S. Litwin, S. Seo, E.A. Golemis, D.C. Connolly // Annual Postdoctoral and Graduate Student Research Conference at Fox Chase Cancer Center. Philadelphia, 2014. – P. 22
7. **Габбасов, Р.Т.** Влияние экспрессии адаптерного белка NEDD9 на агрессивность клеток эпителиального рака яичников мыши / Р. Т. Габбасов, Л. Э. Бикль, Ш. У. О'Брайн // Материалы VII всероссийского конгресса молодых биологов «Симбиоз-Россия». Екатеринбург, 2014 – С. 229-231.
8. **Gabbasov, R.** NEDD9 expression promotes epithelial ovarian cancer growth and dissemination / R. Gabbasov, L.E. Bickel, S.W. O'Brien, S. Litwin, S. Seo, E.A. Golemis, D.C. Connolly // Cancer Research: Proceedings of the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. San Diego, 2014 - № 74 - Abstract № 989.
9. **Gabbasov, R.** NEDD9 expression in primary tumor is important for ovarian carcinoma dissemination in mice / R. Gabbasov, L.E. Bickel, S.W. O'Brien, S. Litwin, S. Seo, E.A. Golemis, D.C. Connolly // Materials of the 18th Annual Postdoctoral and Graduate Student Research Conference at Fox Chase Cancer Center. Philadelphia, 2013 – P. 35.

Адрес для отзыва на автореферат: 420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18, главное здание КФУ, отдел аттестации научных кадров, ученому секретарю диссертационного совета Д 212.081.08 проф. Абрамовой З.И. Факс: (843)238-76-01, e-mail: ziabramova@mail.ru.